UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Gustavo Nóriz Berardinelli

**Análise de marcadores gênicos de estresse genotóxico em
fibroblastos humanos normais e células de glioblastoma**

Ribeirão Preto – SP

2011

Gustavo Nóriz Berardinelli

Análise de marcadores gênicos de estresse genotóxico em fibroblastos humanos normais e células de glioblastoma

Dissertação apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Elza Tiemi Sakamoto-Hojo

Ribeirão Preto – SP

2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Berardinelli, Gustavo Nóriz.

Análise de marcadores gênicos de estresse genotóxico em fibroblastos humanos normais e células de glioblastoma – Ribeirão Preto, 2011

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética

Orientadora: Sakamoto-Hojo, Elza Tiemi

Palavras-chaves: 1. estresse genotóxico; 2. sistema ubiquitna-proteassomo; 3. fibroblastos; 4.glioblastoma; 5. marcadores gênicos

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- ♦ **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP**
(Proc. Nº 2009/03991-2)
- ♦ **CNPq**
- ♦ **CAPES**
- ♦ **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo –**
FMRP-USP
- ♦ **Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade**
de São Paulo – FFCLRP-USP

Dedico esta
dissertação aos meus
pais, **Geraldo** e **Sílvia**
que me incentivam
sempre na busca dos
meus sonhos e à minha
irmã, **Natália**.

Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha professora e orientadora, Prof^a. Dr^a. **Elza Tiemi Sakamoto-Hojo**, por todo o ensinamento e orientação passados durante esses anos de convívio em sala de aula e no laboratório. Por ter me recebido tão bem em seu laboratório e por confiar a mim este trabalho.

À Prof^a. Dr^a. **Catarina Satie Takahashi** pelos ensinamentos e por tudo que uma professora como a senhora tem a oferecer no laboratório e nos momentos de conversas.

Ao Prof. Dr. **Aguinaldo Luiz Simões**, chefe do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Ao Prof. Dr. **Ademilson Espencer Egea Soares**, coordenador do Programa de Pós-Graduação do Departamento de Genética da FMRP/USP.

Às Prof^a. Dr^a. **Zilá Luz Paulino Simões** e **Márcia M. Gentile Bitondi**, por gentilmente cederem equipamentos de seu laboratório que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Às secretárias do Departamento de Genética, especialmente à **Susie**, à **Maria Aparecida**, ao **Gustavo** e à **Sílvia**, pelo apoio constante.

Aos técnicos do Laboratório de Citogenética e Mutagênese, **Luiz Augusto da Costa Júnior** e **Sueli Aparecida Neves**, por toda assistência técnica prestada, ensinamentos e amizade.

Aos **Professores** da banca examinadora, pela disponibilidade em analisar este trabalho.

Aos colegas de trabalho do Bloco G que sempre estiveram dispostos a ajudar e deixam o ambiente de trabalho mais descontraído: **Danilo, Paulo, Ana Paula, Paulinha, Giovana, Flavinha, Fêrnanda, Fêrnanda, Raquel, Cristiano, Leonardo, Tiago, Patrícia, Danillo.**

Aos **colegas do Bloco A** que sempre estavam dispostos a ajudar em dúvidas e a colocar as placas de PCR em tempo real! Muito obrigado mesmo! Aos **colegas do laboratório de Bioinformática**, por todos os ótimos momentos de conversa e descontração passados juntos.

À **Juliana**, por desde o início deste projeto estar do meu lado, por todo o seu carinho, compreensão, zelo e paciência comigo durante todo esse tempo em que estamos juntos e que desenvolvi meu trabalho. Te Amo!

Aos meus amigos **Klaus e Vanessa**, por toda ajuda e momentos de conversa ao longo de todo o tempo. E também a todos os colegas da **41ª** turma de Biologia!

Sumário

<i>Resumo</i>	i
<i>Abstract</i>	ii
1 - INTRODUÇÃO	10
1.1 - Sistema ubiquitina-proteassomo (UPS)	11
1.2 - Sistema UPR (Unfolded-Protein Response)	14
1.3 - Peróxido de Hidrogênio	18
1.4 - Bleomicina	18
2 - OBJETIVOS	20
3 - MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 - Linhagens celulares	21
3.2 - Cultivo Celular	21
3.3 - Tratamentos, Agente Químico e Droga	21
3.4 - Ensaio Cometa	23
3.5 - Extração do RNA total e avaliação das amostras	24
3.6 - Transcrição reversa (RT-PCR) para realização da PCR em tempo real	24
3.7 - PCR em tempo real	25
3.8 - Imunofluorescência	26
3.9 - Forma de análise dos resultados	27
4 - RESULTADOS	29
4.1 - Ensaio Cometa	29
4.2 - Expressão gênica transcricional (qPCR em tempo real)	32
4.3 - Expressão protéica por imunofluorescência	39
5 - DISCUSSÃO	43
6 – CONCLUSÕES	56
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
8 - ANEXOS	65

Resumo

Muitos genes têm sido indicados como responsivos ao estresse genotóxico, mas devido à necessidade de validação, a busca por marcadores gênicos continua. Vários genes são relacionados ao sistema ubiquitina-proteassomo (UPS), o qual é responsável pela remoção seletiva de proteínas, sendo que falhas no UPS têm sido relacionadas a doenças neurodegenerativas e ao câncer. Assim, o presente trabalho teve como objetivo a busca e confirmação de marcadores gênicos de resposta ao estresse genotóxico, por meio do estudo da expressão transcricional e protéica dos genes *ERN1*, *EIF2AK3*, *GADD153* e *TRAF2*, visando à confirmação das respostas em linhagens de fibroblastos (GM07492A e AS405) e de glioblastoma (U87MG), sob tratamentos com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e Bleomicina (Blm). Foram utilizados o Ensaio Cometa, a análise de expressão gênica transcricional por qPCR em tempo real e de expressão gênica ao nível protéico (imunofluorescência). Os resultados mostraram que os tratamentos empregados foram capazes de induzir danos no DNA, sendo que a sensibilidade ao tratamento e a capacidade de recuperação das linhagens foi variável dependendo do agente testado. A análise de expressão gênica mostrou que GM07492A apresentou indução dos genes *ERN1* e *GADD153* após tratamento com H₂O₂ (resposta precoce, zero e 2 h) e Blm (durante todo pós-tratamento). A linhagem AS405 exibiu indução de *ERN1* e *GADD153* para H₂O₂, enquanto que para Blm foram induzidos os genes *EIF2AK3* e *GADD153*. Para U87MG, a indução de *EIF2AK3* pelo H₂O₂ ocorreu de modo tardio, enquanto *GADD153* mostrou-se induzido após ambos os tratamentos. A proteína ERN1 apresentou expressão discreta e pontual, inclusive nos pontos onde não houve indução transcricional, indicando uma expressão basal. Essa proteína se expressou em GM07492A no tratamento com Blm em zero hora, diferentemente de AS405. Para U87MG tratada com H₂O₂ observou-se discreta expressão de ERN1, sendo mais evidente para Blm. Quanto à proteína GADD153, esta foi expressa em fibroblastos nos vários tempos analisados. No entanto, U87MG mostrou expressão nuclear apenas nas células tratadas, sendo mais evidente para H₂O₂ comparativamente à Blm. Assim, as alterações observadas nos perfis de expressão gênica são compatíveis com a indução de danos no DNA, indicando o envolvimento de genes do UPS nas respostas celulares ao estresse genotóxico. Em conjunto, os resultados estimulam uma avaliação mais detalhada desses genes como marcadores de resposta ao estresse e evidencia a sua importância no cenário da via UPS.

Abstract

Many genes have been reported as responsive to genotoxic stress, but due to the need of validation, the search for genetic markers still continues. Several genes are related to the ubiquitin-proteasome system (UPS), which is responsible for the selective removal of proteins, and UPS failures have been associated to neurodegenerative diseases and cancer. Thus, this study aimed the search and confirmation of genetic markers that were responsive to genotoxic stress. For this, we evaluated the transcriptional or protein expression of the genes *ERN1*, *EIF2AK3*, *GADD153* and *TRAF2*, seeking confirmation of responses in fibroblast cell lines (GM07492A and AS405) and glioblastoma (U87MG) under treatment with hydrogen peroxide (H₂O₂) and bleomycin (BLM). We used the Comet Assay, the transcriptional analysis of gene expression by quantitative real-time PCR and protein expression by immunofluorescence. The results showed that the treatments employed were able to induce DNA damage, and that cell sensitivity to treatments and recovery capability of cell lines varied according to the tested agent. The gene expression analysis showed that GM07492A presented induction of *ERN1* and *GADD153* genes after treatment with H₂O₂ (early response, zero and 2 h) and BLM (throughout the post-treatment). The cell line AS405 showed induction of *GADD153* and *ERN1* after H₂O₂, whereas with BLM the genes induced were *EIF2AK3* and *GADD153*. For U87MG, the induction of *EIF2AK3* by H₂O₂ occurred at a later stage, while *GADD153* was promptly induced after both treatments. The protein ERN1 showed discreet and punctual expression, even at time point without transcriptional induction, indicating a basal expression. This protein was expressed in GM07492A by treatment with BLM at zero hour, differently of AS405. For U87MG treated with H₂O₂, ERN1 showed a slight expression, being more evident for BLM. Regarding *GADD153*, protein expression was observed in fibroblasts at all time point. However, U87MG showed nuclear expression only in cells treated with H₂O₂, being more evident than in BLM-treated cells. Thus, the observed changes in gene expression profiles are consistent with the induction of DNA damage, which indicates the participation of UPS genes in cellular responses to genotoxic stress. Together, the results encourage further evaluation of these genes as markers of stress response, demonstrating its importance in the UPS acting scope.

1 - INTRODUÇÃO

Existe uma série de trabalhos sobre a indução de danos oxidativos por agentes endógenos e exógenos, os quais contribuem para o desenvolvimento de doenças relacionadas à idade (neurodegenerativas, principalmente) e outras somáticas, como o câncer. Muitos genes têm sido indicados como responsivos ao estresse genotóxico, mas ainda não existe confirmação para a maioria deles, visto que muitos fatores influenciam as respostas celulares (incluindo-se o *background* genético, a idade, os tipos de tecidos, entre outros), o que faz com que a busca por marcadores gênicos ainda continue. São ainda escassos estudos sistemáticos direcionados à expressão de genes que possam ser validados como de estresse genotóxico (radiação ionizante e drogas antineoplásicas, tais como: bleomicina, cisplatina, temozolomida, etoposido), sendo relevante a confirmação das respostas em diferentes tipos celulares (tais como: linfócitos, fibroblastos, glioblastoma) e sob diferentes níveis e condições de tratamento.

Muitos dos genes associados a agentes genotóxicos são da classe de reparo do DNA ou classes relacionadas, sendo que algumas dessas têm genes implicados nas respostas ao estresse ao nível de retículo endoplasmático (RE), com funções relacionadas ao sistema ubiquitina-proteassomo (UPS) e UPR (*unfolded-protein response*).

De acordo com uma série de dados obtidos pelo grupo do presente laboratório em experimentos de “*microarrays*”, vários genes foram transcricionalmente modulados para pelo menos duas condições (radiações ionizantes e drogas antineoplásicas), pertencendo às famílias: CYP, DNAJ, EIF, LIMK e MAPK. Esses genes mostraram-se modulados (reprimidos ou induzidos) em

células de glioblastoma, linfócitos e/ou fibroblastos sob diferentes níveis e condições de tratamento. O gene *ARHGEF7*, por exemplo, mostrou-se reprimido em células de glioblastoma tratadas com temozolomida (TMZ) (40 μ M) e em linfócitos irradiados com baixas doses de raios-gama, sendo por outro lado, induzido em fibroblastos normais tratados com cisplatina 25 μ M. Já o gene *LIMK2* foi induzido em células de glioblastoma tratadas com a TMZ e reprimido nas mesmas células tratadas com a cisplatina; no entanto, *LIMK1* mostrou-se induzido em fibroblastos irradiados com 4 Gy (Fachin *et al.*, 2007a, Bassi *et al.*, 2008, Fachin *et al.*, 2009a Carminati *et al.*, 2010).

Assim, vários trabalhos sobre a indução de alterações na expressão gênica transcricional sob condições de estresse genotóxico mostraram a indução ou a repressão de genes cruciais no controle de diversas funções biológicas que asseguram a homeostase do organismo. Tanto a ativação quanto a repressão transcricional observada para uma série de genes pertencentes a diferentes classes impõem alterações metabólicas que podem comprometer os processos fisiológicos do organismo, o que merece ser ainda investigado.

1.1 - Sistema ubiquitina-proteassomo (UPS)

Os níveis em que as proteínas são expressas nas células são determinados pelo balanço entre a taxa de produção destas e a taxa de degradação. A ocorrência de alterações nesse balanço pode afetar drasticamente os processos fisiológicos, principalmente no caso de proteínas regulatórias (Coux *et al.*, 1996, Hochstrasser, 1996).

O proteassomo é um complexo protéico (complexos cilíndricos multi-catalíticos) responsável pela degradação intracelular de proteínas, processo este

dependente de energia. É um complexo de proteases altamente sofisticado que desempenha uma seletiva, eficiente e progressiva hidrólise de proteínas (Tanaka, 2009). Muitas evidências o apontam como responsável pela degradação da maioria das proteínas nativas regulatórias, bem como das proteínas alteradas (oxidadas) e mal-dobradas (Coux *et al.*, 1996). Recentemente, um número crescente de estudos tem incluído o proteassomo 26S no controle das interações dos fatores iniciais de transcrição e sua localização e abundância na regulação do início da transcrição ou ativação por meio de múltiplas vias. O proteassomo 26S é uma maquinaria proteolítica não-lisossomal que nos eucariotos, consiste de uma porção proteolítica cerne (20S) e uma regulatória (19S) (Bhaumik e Malik, 2008). Dados da literatura indicam que essas duas subunidades podem funcionar independentemente. A ausência da porção 19S está relacionada com a diminuição da elongação dos transcritos, enquanto que a falta da 20S leva a um aumento da elongação. Isso demonstra uma regulação diferencial entre elongação e terminação desempenhada pelas subunidades do UPS (Bhat e Greer, 2011).

O sistema proteassomo atua como um controlador maior de múltiplas vias de transdução de sinais, cuja atividade é afetada por uma variedade de agentes causadores de estresse oxidativo, incluindo os agentes químicos e físicos, além da temperatura e agentes virais (Pervan *et al.*, 2005). Esse sistema extremamente organizado desempenha papéis importantes no controle de diversas atividades celulares básicas, catalisando reações biológicas de modo rápido e unidirecional (Tanaka, 2009).

Nas células eucarióticas, a principal via de degradação de proteínas de meia-vida curta não é lisossomal, sendo dependente de ATP e de ubiquitina. A polimerização da ubiquitina serve como um sinal para a degradação de inúmeras

proteínas alvo. A degradação de uma proteína é iniciada pela ligação covalente de uma cadeia composta por várias cópias de ubiquitinas, através da ação de uma rede de proteínas incluindo as enzimas: E1 (*ubiquitin-activating*), E2 (*ubiquitin-conjugating*) e E3 (*ubiquitin-ligating*) (Tanaka, 2009, Al-Hakim *et al.*, 2010).

A ubiquitina encontra-se presente em todas as células eucarióticas e é uma das proteínas mais conservadas em termos de sequência; é constituída por 76 resíduos de aminoácidos, sendo sintetizada na forma de precursores codificados por vários genes. Tais precursores são proteínas ribossomais ligadas à ubiquitina ou várias moléculas de ubiquitina ligadas entre si (Ramos e Ferreira, 2005, Al-Hakim *et al.*, 2010).

As proteínas poli-ubiquitinadas são reconhecidas e degradadas pelo proteassoma 26S. A via proteolítica dependente de ubiquitina atua tanto no citoplasma quanto no núcleo das células, sendo responsável pela degradação de proteínas associadas ao retículo endoplasmático (RE) (Tanaka, 2009, Ramos e Ferreira, 2005).

Assim, o sistema ubiquitina-proteassomo (UPS) tem sido considerado o principal mecanismo responsável pela remoção de proteínas oxidadas. Tal mecanismo é capaz de discriminar entre proteínas normais e alteradas e de remover seletivamente as proteínas que necessitam sofrer degradação (Kaushik e Cuervo, 2006). Isso faz com que a remoção apropriada de proteínas oxidadas seja um importante determinante da capacidade de reparo celular da resposta ao estresse genotóxico. O UPS controla muitos processos celulares básicos, tais como: progressão do ciclo celular, transdução de sinal, morte celular, respostas imunes, metabolismo, controle da qualidade protéica e desenvolvimento (Varshavsky, 2005, Tai e Schuman, 2008). Esse sistema atua também nos mecanismos de regulação

epigenética, na elongação de transcritos e na regulação de fatores de transcrição (Bhat e Greer, 2011).

Falhas no funcionamento do UPS têm sido relacionadas a diversas doenças, principalmente as neurodegenerativas (doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington), várias síndromes genéticas (fibrose cística, síndrome de Angelman) e muitos cânceres. Diversas evidências já apontam o UPS como um novo sistema alvo em potencial para ser usado no tratamento de algumas doenças, uma vez que recentes descobertas sugerem que alguns inibidores de proteassomo possuem potencial terapêutico. Dentre esses, temos como exemplo a droga *Velcade* (*bortezomib*), um inibidor do proteassomo, que exemplifica uma aplicação terapêutica envolvendo componentes do UPS (Al-Hakim *et al.*, 2010). Vários genes relacionados ao UPS, cujas funções têm sido encontradas alteradas, têm sido associados a doenças neurodegenerativas e cânceres (Paul, 2008).

Na literatura, as informações acerca das investigações sobre a origem das doenças neurodegenerativas visam elucidar as vias fisiopatológicas comuns implicadas no processo de desenvolvimento destas, que envolvem o estresse oxidativo, formação de proteínas mal dobradas ou agregadas e a disfunção do UPS (Ramirez *et al.*, 2006). Muitas evidências suportam a hipótese de que esses fatores associados ao estresse ao nível do RE podem causar morte neuronal, seja por apoptose ou por autofagia (Nagatsu e Sawada, 2006, Chen e Yin, 2011).

1.2 - **Sistema UPR (Unfolded-Protein Response)**

O retículo endoplasmático (RE) responde ao estresse com o início de uma cascata de eventos conhecida como “*unfolded-protein response*” (UPR). Sob condições adversas em que são produzidas proteínas alteradas (*unfolded-proteins*),

ocorre a ativação do UPR levando a uma ativação da transcrição de vários genes e à concomitante redução da tradução protéica (Kim *et al.*, 2008). Os organismos eucarióticos possuem vias de sinalização para assegurar que o RE se mantenha em pleno funcionamento, com sua capacidade e ação principal de atuar no mecanismo de dobramento de proteínas (*folding-protein*), contribuindo para a homeostase. Em consequência, o efeito final é a redução da quantidade de novas proteínas que seriam translocadas para o RE, conferindo tempo e maior capacidade de o RE processar a degradação de proteínas alteradas (Forman *et al.*, 2003).

A Figura 1 apresenta o esquema ilustrativo de uma série de proteínas sensoras que atuam nesse mecanismo de respostas coordenadas, promovendo a adaptação ao estresse, ou alternativamente a morte celular (Forman *et al.*, 2003). As principais proteínas são: HSPA5 (BIP/GRP78), ERN1 (IRE1), ATF6, EIF2AK3 (PERK), TRAF2, ATF4 e CHOP (GADD153). As vias sensoras de estresse no RE são reguladas por chaperonas HSPA5 (BIP/GRP78) que promovem o dobramento adequado de proteínas no RE de forma dependente de ATP. Sua provável função está ligada à formação de complexo multimérico (IRE1/ATF6/PERK) de proteínas dentro do RE, sob condições de estresse, protegendo as células contra a disfunção dessa organela (Ting e Lee, 1988).

Figura 1: A resposta a proteínas alteradas (UPR) se inicia com uma chaperona do RE, a HSPA, que regula negativamente as três proteínas sensoras: ERN1(IRE1), ATF6 e EIF2AK3 (PERK). Na presença de uma proteína mal-dobrada, ou alterada no RE, a HSPA se dissocia dos sensores e se liga a essa proteína, na tentativa de dobrá-la e assim, liberando os sensores da inibição e ativando múltiplas vias de sinalização, que culminam na indução dos genes induzidos por UPR e repressão no mecanismo de tradução. Essas mudanças aumentam a capacidade de dobramento do RE, reduz a translocação de novas proteínas para ele e aumenta a degradação de proteínas mal processadas. Com a ativação prolongada da UPR, as três moléculas sensoras iniciam uma cascata distinta, à qual leva à morte celular programada. (*) mutação familiar em PS1; (**) A β : β -amilóide (Forman *et al.*, 2003, adaptado para o Português).

O gene *ERN1* (*IRE1*) codifica uma proteína cuja atividade quinase e endonuclease é importante para a resposta a sinais de estresse no RE, atuando como um sensor de proteínas mal dobradas no lúmen do RE. O domínio da endonuclease cliva o RNAm XBP1 convertendo-a em um potente ativador transcrricional, cuja ação culmina com a sinalização posterior para bloqueio do crescimento e apoptose (Bi *et al.*, 2005). Já o gene *EIF2AK3* (*PERK*), que atua conjuntamente com *ATF6* e *IRE1*, participa do mecanismo de UPR como um efetor de resposta a proteínas mal dobradas. Foi demonstrado que, sob condições de hipóxia/anóxia, as células transformadas e tumorais são capazes de promover a

adaptação das células ao estresse gerado no RE, sendo que a inativação dessa sinalização por mutações no gene PERK bloqueia a sobrevivência celular sob hipóxia, reforçando a importância do mecanismo UPR na proteção celular (Bi *et al.*, 2005).

Em resumo, o mecanismo de UPR consiste na ativação dos genes *IRE1*, *PERK* e *ATF6*, que levam à transcrição de vários outros genes. O fator de transcrição ATF6 promove a ligação de elementos do sistema de genes UPR, incluindo o *XBP1*. O produto do *ATF6* é ativado quando sofre duas clivagens proteolíticas dentro do complexo de Golgi, liberando o fragmento citosólico, que então é translocado para o núcleo. Quando um prolongado estado de UPR ocorre, alterações culminam em ativação de morte por apoptose, via indução de genes pró-apoptóticos. Ainda, a atuação dos genes *IRE1*, *PERK* e *ATF6* leva à tradução de vários genes pro-apoptóticos. Nesse processo, a ativação do gene *IRE1* recruta TRAF2 para a membrana do RE. *TRAF2* ativa *ASK1* que então ativa a cascata JNK e as caspases da via apoptótica na mitocôndria (Forman *et al.*, 2003).

Os estudos de expressão gênica em larga escala conduzidos em células irradiadas ou tratadas com drogas antitumorais (cisplatina e temozolomida) identificaram vários genes com funções direta ou indiretamente relacionadas ao sistema de proteólise e ubiquitina proteassomo, sendo que esses responderam ao estresse genotóxico provocado por dois ou três agentes, tanto com indução quanto repressão, dependendo do gene e tipo celular (dados do presente laboratório (Fachin *et al.*, 2007b, Fachin *et al.*, 2009b, Sakamoto-Hojo *et al.*, 2003b, Bassi *et al.*, 2008). Assim, sob doses baixas de irradiação em linfócitos, detectou-se o gene *ATF6*. Além disso, outros genes da família das chaperonas HSPA foram modulados:

HSPA14 (induzido em fibroblastos irradiados) e *HSPA9* (induzido em fibroblastos normais e reprimido em fibroblastos AT sob tratamento com cisplatina).

Genes participantes do processo de apoptose relacionado ao estresse de RE também foram detectados, tais como *TRAF2* e *TRAF3IP2*. Em linhagens de fibroblastos primários irradiados ou tratados com a cisplatina, o gene *DNAJC13*, que também participa no processo de UPR, foi modulado tanto em fibroblastos normais quanto em AT (Mello, 2006). Em células de glioblastoma, um gene da mesma família, *DNAJA1*, foi também induzido.

1.3 - **Peróxido de Hidrogênio**

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um dos oxidantes mais versáteis que existe, superior ao cloro, dióxido de cloro e permanganato de potássio. É através da catálise que o H_2O_2 pode ser convertido em radical hidroxila ($\bullet OH$) com reatividade inferior apenas ao flúor. Apesar do poder de reação, o peróxido de hidrogênio é um metabólito natural em muitos organismos; sendo decomposto, resulta em oxigênio molecular e água. É reconhecidamente citado como o oxidante mais eficiente, mas é também capaz de causar quebras no DNA (Valko *et al.*, 2006). Salienta-se que o H_2O_2 tem sido avaliado em tecidos de animais predadores e em seres humanos, devido à relação direta entre os distúrbios celulares e o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio (Mattos, 2003, Valko *et al.*, 2006).

1.4 - **Bleomicina**

A bleomicina (BLM) é um antibiótico descoberto em 1966 por Hamao Umezawa sendo obtida de uma cepa de bactérias *Streptomyces verticillus*. Esta droga apresenta atividade antineoplásica e antibacteriana, tanto *in vivo* quanto *in*

vitro (Vig e Lewis, 1978). Tem se mostrado importante no tratamento de neoplasias, quer como agente único ou em combinações com outros agentes quimioterápicos. Atualmente, é empregada no tratamento de diversos tipos de cânceres, incluindo principalmente câncer testicular, linfomas, cânceres de cabeça e pescoço e de linhagens germinativas. No entanto, o uso terapêutico dessa droga apresenta limitações e restrições visto aos seus efeitos colaterais, dependentes da dose, que podem levar à fibrose pulmonar (Chen e Stubbe, 2004, Chen e Stubbe, 2005, Chen *et al.*, 2008).

O mecanismo de ação da bleomicina responsável pela morte celular ainda não está completamente esclarecido. Seu principal efeito reside sobre o DNA, por meio da indução de quebras na fita simples (*single-strand break*) e quebras de fita dupla (*double-strand break*), causando danos semelhantes às radiações ionizantes, razão pela qual a droga é conhecida como radiomimético. As quebras simples ocorrem em maior número sob tratamento com baixas concentrações, enquanto as quebras duplas ocorrem em maior frequência sob altas concentrações (Orford *et al.*, 1995, Limp-Foster e Kelley, 2000). Como resultado dessas lesões, ocorre a indução de aberrações cromossômicas, inibição de síntese de proteínas, inibição da incorporação de timidina nas fitas de DNA, dentre outros efeitos. A geração de radicais livres é observada como efeito secundário ao tratamento com a droga. As respostas celulares são complexas e mostram-se dependentes da linhagem celular e do genótipo, apresentando como resultado mais comum a parada no ciclo celular, apoptose e morte celular mitótica (Ramotar e Wang, 2003, Chen e Stubbe, 2005).

2 - OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral a busca de marcadores gênicos de estresse genotóxico por meio do estudo da expressão em níveis transcricional e protéico, de uma série de genes já indicados como responsivos ao estresse genotóxico, visando a confirmação dessas respostas em dois tipos celulares (fibroblastos humanos normais e células de glioblastoma) sob tratamentos com peróxido de hidrogênio e bleomicina.

Objetivos específicos:

- Analisar a indução de danos no DNA e cinética de reparo nos tempos pós-tratamento, de zero, 2, 4 e 6 horas, em resposta aos tratamentos com bleomicina e peróxido de hidrogênio, realizados em culturas de fibroblastos humanos normais e células de glioblastoma, utilizando o Ensaio Cometa.
- Analisar a expressão gênica transcricional (análise por qPCR em tempo real) de genes ligados ao sistema ubiquitina-proteassomo e UPR (*ERN1(IRE1)*, *EIF2AK3(PERK)*, *GADD153(CHOP)* e *TRAF2*) em fibroblastos humanos normais e células de glioblastoma, sob tratamento com bleomicina e peróxido de hidrogênio, analisados em diferentes tempos (zero, 2, 4 e 6 horas) de pós-tratamento.
 - Analisar a expressão gênica em nível protéico para proteínas cujos genes se mostraram induzidos significativamente em resposta ao estresse genotóxico em fibroblastos humanos normais e células de glioblastoma, sob tratamento com bleomicina e peróxido de hidrogênio, analisados em diferentes tempos (zero, 2, 4 e 6 horas), utilizando-se o método de imunofluorescência.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Linhagens celulares

Foram utilizadas as seguintes linhagens celulares:

- **AS405:** fibroblastos humanos normais, linhagem primária.
Procedência: células gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck (ICB-USP);
- **GM07492** lote A: fibroblastos humanos normais, linhagem primária.
Procedência: adquiridas do banco Coriell Cell Repository (CCR).
- **U87MG:** células de glioblastoma. Procedência: células gentilmente cedidas pela Prof^a. Dr^a. Mari Sogayar (IQ-USP).

3.2 - Cultivo Celular

As linhagens de fibroblastos e as células de glioblastoma, previamente mantidas congeladas em nitrogênio líquido, foram cultivadas em monocamada, em meio HAM F10+DEM suplementado com 15% de soro bovino fetal, em estufa CO₂ (5%) e a 37°C, até atingirem o estado de semiconfluência para serem subcultivadas e expostas a diferentes tipos de tratamento. As células foram colhidas em tempos variáveis para a aplicação de ensaios e testes.

3.3 - Tratamentos, Agente Químico e Droga

As células foram submetidas ao protocolo de tratamento:

- Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) (Perhydrol® - Merck): concentração de 80 μM e tempo de tratamento de 30 minutos para as linhagens de fibroblastos. Concentração de 400 μM e tempo de tratamento de 60 minutos para as células de glioblastoma.
- Bleomicina (Sulfato de Bleomicina 15U - Bonar® - Biosintética): concentração de 30 $\mu g/mL$ e tempo de tratamento de 24 horas para ambos os tipos celulares.

Após os tempos de tratamento as culturas foram lavadas e foi adicionado meio de cultura novamente.

Protocolo geral de cultivo e tratamento com H_2O_2 :

Protocolo geral de cultivo e tratamento com Bleomicina:

3.4 - **Ensaio Cometa**

Após os tratamentos, em momentos variáveis, foram transferidos 400 µL de suspensão celular para um microtubo de 1,5 mL, sendo então submetidos à centrifugação de 500 rpm, a temperatura ambiente, por 5 minutos. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet*, sendo acrescentados 200 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%, 37°C), misturando-se levemente. O material de cada microtubo, então, foi transferido para duas lâminas recém-preparadas com a primeira camada de agarose de ponto de fusão normal (1,5%). Foram colocadas as lamínulas sobre o material e em seguida as lâminas foram levadas à geladeira por 5 minutos. Logo após as lamínulas foram retiradas. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton X-100 e DMSO; pH 10) por 24 horas, permanecendo em geladeira durante todo o tempo. As lâminas foram retiradas da solução e mergulhadas em solução tampão de eletroforese (EDTA 0,2 M e NaOH 10 M) por 20 minutos, a 4°C, sendo assim, levadas para a cuba de eletroforese. Realizou-se uma eletroforese a 25 V (1 v/cm) e 300 mA por 20 minutos. Posteriormente as lâminas foram mergulhadas em solução de neutralização (Tris/HCl 0,4 M; pH 7,5) por 20 minutos. O material foi retirado e seco à temperatura ambiente, quando então, foi fixado em etanol 100%. Para a coloração do material, foram adicionados 50 µL de *SYBR® Green I* (Invitrogen) em uma diluição de 2X, sobre a lâmina, que foi coberta por uma lamínula.

3.5 - **Extração do RNA total e avaliação das amostras**

Para proceder a extração de RNA total das linhagens foi utilizado o *kit RNAspin Mini RNA Isolation – illustra – GE Healthcare*, conforme as instruções do fabricante.

As amostras foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (*NanoDrop Technologies*) nos comprimentos de onda 230 nm, 260 nm e 280 nm. A pureza do RNA foi avaliada pelas razões A_{260}/A_{280} , sendo considerados adequados os valores próximos a 2, que demonstram ausência de contaminação por proteínas e DNA, e A_{260}/A_{230} , sendo que valores inferiores a 1,7 ou superiores a 2,2 demonstram contaminação por compostos orgânicos, tais como o fenol. As amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose com formaldeído para a avaliação da integridade do RNA obtido.

3.6 - **Transcrição reversa (RT-PCR) para realização da PCR em tempo real**

Para a preparação do cDNA a ser utilizado nas reações de PCR em tempo real, foi necessário primeiramente remover todas as moléculas de DNA das amostras de RNA. Para tanto, foi utilizado o *kit Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen)*.

Na reação de RT-PCR propriamente dita, foi utilizado o *kit Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen)*, adicionando 0,5 µL de *oligo DT primer* (500 ng/µL) aos RNAs provenientes das amostras da reação com a DNase e incubados a 70°C por 10 minutos e, ao final, foram colocadas as amostras no gelo. Adicionou-se então aos tubos um *mix* contendo 4 µL de *First-strand buffer 5X*, 2 µL de DTT 0,1 M, 1 µL de dNTP 10 mM e 1 µL de *Superscript III RT 200 U/µL (Invitrogen)*,

incubando-se as amostras primeiramente por 50 min a 50° C e finalmente a 70° C por 15 minutos. Ao final da reação, foi realizada uma reação de PCR convencional para um gene constitutivo, o *B2M*, a fim de testar a integridade das amostras de cDNAs, que posteriormente foram estocadas a -20° C até sua utilização nos ensaios de PCR em tempo real.

3.7 - **PCR em tempo real**

Para determinar a quantidade inicial do número de cópias do gene de interesse, foi utilizado o *kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)*. As reações foram realizadas num volume final de 15 µL (7,5 µL de PCR Master Mix, 0,75 µL de *primer forward*, 0,75 µL de *primer reverse*, 5,4 µL de água livre de RNase e 0,6 µL de cDNA da amostra), sendo montadas em placas de 96 poços.

Após a montagem das reações de PCR, as placas foram seladas. Foram feitas a incubação e a ciclagem, utilizando-se o seguinte programa: incubação (2 minutos a 50°C), ativação da Taq (15 minutos a 95°C) e 40 ciclos de: denaturação (15 segundos a 95°C), anelamento (30 segundos a 56°C) e extensão (30 segundos a 72°C). Após esse programa, ainda foi realizada a curva de dissociação/fusão.

Tabela 1: Lista de iniciadores (*primers*) utilizados nas reações de RT-PCR e PCR em Tempo Real.

PRIMERS		
Genes	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<i>ERN1(IRE1)</i>	5'-ACGGACGTCAAGTTTGATCC-3'	5'-TTGGTAGACGCAGACAGTGG-3'
<i>EIF2AK3(PERK)</i>	5'-CCTCACCATTTCCTAAGGA-3'	5'-GGGGGACTTTCCTTCTTCTG-3'
<i>GADD153(CHOP)</i>	5'-CCCTCACTCTCCAGATTCCA-3'	5'-CTGGGGAATGACCACTCTGT-3'
<i>TRAF2</i>	5'-AGTTTTGTGGTGCTGGCTCT-3'	5'-ACTCAGCCCCCGTAAGATTT-3'
<i>B2M</i>	5'-AGGCTATCCAGCGTACTCCA-3'	5'-TCAATGTCGGATGGATGAAA-3'
<i>HPRT1</i>	5'-TCATTATGCTGAGGATTTGGA-3'	5'-GATGGCCTCCCATCTCCTT-3'

Tabela 2 – Genes estudados para avaliação de expressão transcricional por PCR em tempo real.

Símbolo	Nome
ERN1(IRE1)	<i>Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1</i>
EIF2AK3(PERK)	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3</i>
GADD153(CHOP ou DDIT3)	<i>DNA-damage-inducible transcript 3</i>
TRAF2	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
B2M	<i>Beta-2-microglobulin</i>
HPRT1	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>

3.8 - Imunofluorescência

As células foram semeadas e cultivadas sobre lamínula em placa de 12 poços. Após o tratamento com H₂O₂ e bleomicina nos tempos e concentrações adequadas, as células foram fixadas com paraformaldeído 2% por 20 min. Em seguida, foram lavadas com PBS e PBS-Glicina 0,1 M por 10 min e então permeabilizadas com PBS-Triton 0,3% por 15 min. Após a permeabilização, as células foram lavadas com PBS e realizou-se bloqueio com PBS-BSA 3% + soro normal de galinha diluído 1:100 por 1 hora a temperatura ambiente. Após bloqueio, as células foram incubadas com o anticorpo primário (1:200) para as proteínas ERN1 e GADD153 (ambos da *Santa Cruz Biotechnology, Inc*), por 1 hora em temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, as células foram incubadas com o anticorpo secundário *chicken anti-rabbit-alexa 488* (coloração verde) diluído 1:200, com incubação por 1 hora. Posteriormente, as células foram incubadas com DAPI (0,15 µg/ml) por 5 min ao abrigo da luz. Finalmente, as lâminas foram montadas com meio de montagem Vectashield (*Vector Laboratories, Inc*) e analisadas em microscópio de fluorescência – Axiophot Carl Zeiss.

3.9 - **Forma de análise dos resultados**

Ensaio Cometa (danos no DNA e cinética de reparo) - O material foi analisado em microscópio de fluorescência (ZEISS, filtro 516-560nm e barreira de filtro de 590 nm), em aumento de 20x. Foram analisados 50 nucleóides/amostra, sendo observadas as células com contorno circular (nucleóides sem danos de DNA) ou em forma de “cometa” (nucleóides com danos no DNA), no qual a extensão da cauda reflete a distância de migração da fita de DNA danificada, seguida de captura de imagem digital (Câmera Stingray - Allied). As imagens obtidas foram analisadas pelo programa Comet Assay IV, *Perceptive Instruments*, que fornece os valores de porcentagem de DNA na cauda baseados nos *pixels* dos fragmentos de DNA. Os resultados gerados pelo programa foram plotados em planilhas e submetidos em seguida às análises estatísticas. Utilizou-se o teste estatístico *One Way ANOVA*, seguido pelo método Bonferroni de múltiplas comparações. Foram consideradas como diferenças estatisticamente significativas os valores de $p < 0,05$. O *software* utilizado para a análise estatística foi o SigmaStat 3.5 (*Systat Software*).

Expressão gênica por PCR em tempo real - As amostras de RNA provenientes de três experimentos foram utilizadas para determinar a quantidade inicial do número de cópias do gene de interesse, utilizando-se o método de curva-padrão relativa para cada gene, por meio da diluição seriada de uma amostra conhecida. Foi utilizado o *software* REST (*Relative Expression Software Tool*) 2009 (QIAGEN) (Pfaffl *et al.*, 2002) para estimar a regulação gênica para os estudos de expressão gênica e realizar as análises estatísticas baseadas em *randomizations* e *bootstrap*.

Expressão protéica por imunofluorescência – As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Axiophot (Carl Zeiss, Alemanha), equipado com a câmera digital AxioCam (Zeiss), sob o controle do programa AXIOVISION 4.2 (Carl Zeiss, Alemanha). Uma célula foi capturada (fotografada) exemplificando com detalhes o todo da lâmina. O processamento das imagens foi realizado com o auxílio do programa Photoshop CS (*Adobe Systems*). Para que as imagens ficassem comparáveis, foram mantidas as mesmas configurações e tempos de exposição, assim como o pós-processamento em programas adequados.

4 - RESULTADOS

4.1 - Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa visa mensurar os níveis de dano no DNA causado pelo tratamento, além de permitir a análise da cinética de reparo destes danos com base em diferentes tempos de análise pós-tratamento. A presença de um controle em cada tempo teve como objetivo garantir que os danos detectados fossem somente em decorrência do tratamento aplicado. No presente trabalho, o Ensaio Cometa confirmou que o tratamento empregado é capaz de causar danos ao DNA, o que possibilita associar o estresse genotóxico às alterações na expressão gênica ou protéica.

Ambos os tratamentos empregados nas linhagens estudadas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) no tempo zero hora, demonstrando que o tratamento foi capaz de causar danos às células e que estes apresentaram níveis significativos, com valores variando de acordo com cada linhagem celular. Além disso, observou-se que dependendo do tratamento as células se mostraram capazes de recuperarem praticamente todo o dano inicial sofrido após o tempo de 6 h.

Para o tratamento envolvendo H_2O_2 , todas as linhagens apresentaram danos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em zero hora com valores entre 50% e 75%, aproximadamente (Figuras 2, 3 e 4) (Anexo A - Tabelas 3, 4 e 5). Para a linhagem AS405 temos uma recuperação dos danos sofridos já com 2 horas de pós-tratamento, demonstrando uma provável ação dos mecanismos de reparo (Figura 3). Já para GM07492A temos em 2 horas de pós-tratamento níveis ainda significativos e

observa-se uma recuperação somente após 4 horas (Figura 2). As células U87MG apresentam danos significativos em todos os tempos analisados, o que mostra uma provável ação tardia dos mecanismos de reparo e uma maior sensibilidade ao tratamento se comparada às outras duas linhagens (Figura 4).

No tratamento com Bleomicina, as linhagens estudadas também apresentaram níveis de danos significativos ($p < 0,05$) em zero hora com valores entre 45% e 70%, aproximadamente (Figuras 2, 3 e 4) (Anexo A - Tabelas 3, 4 e 5). Diferentemente do outro tratamento, as células não apresentaram uma recuperação dos danos nos tempos analisados. Isso mostra uma provável ação tardia ou mais lenta dos mecanismos de reparo atuantes na correção destes tipos de danos gerados pela droga utilizada. A linhagem GM07492A apresentou níveis de dano mais elevados se comparada com as outras duas linhagens nesse tratamento (Figura 2). A AS405 apresentou uma maior redução nos níveis pós-tratamento, embora ainda estatisticamente significativos (Figura 3). No tempo de 6 horas, as células U87MG não apresentaram níveis de dano estatisticamente significativos embora os valores tenham se mantido elevados; provavelmente, essa diferença não significativa deve-se provavelmente a variações experimentais (Figura 4).

Figura 2 – Porcentagem de DNA na cauda obtida no Ensaio Cometa, realizado na linhagem GM07492A tratada com H₂O₂ (30 min e 80 µM) e Bleomicina (24 h e 30 µM), em diferentes tempos pós-tratamento. Os dados estão representados como média ± desvio-padrão. *: diferença estatisticamente significativa (p<0,05) para comparação com o controle.

Figura 3 – Porcentagem de DNA na cauda obtida no Ensaio Cometa, realizado na linhagem AS405 tratada com H₂O₂ (30 min e 80 µM) e Bleomicina (24 h e 30 µM), em diferentes tempos pós-tratamento. Os dados estão representados como média ± desvio-padrão. *: diferença estatisticamente significativa (p<0,05) para comparação com o controle.

Figura 4 – Porcentagem de DNA na cauda obtida no Ensaio Cometa, realizado na linhagem U87 tratada com H₂O₂ (60 min e 400 μ M) e Bleomicina (24 h e 30 μ M), em diferentes tempos pós-tratamento. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio-padrão. *: diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação com o controle.

4.2 - Expressão gênica transcricional (qPCR em tempo real)

A expressão gênica ao nível transcricional foi analisada para quatro genes: *ERN1*, *EIF2AK3*, *GADD153* e *TRAF2*, os quais participam do sistema ubiquitina-proteassomo. Após o tratamento das células, foram extraídos RNAs para análise de expressão em quatro diferentes tempos: zero, 2, 4 e 6 horas.

Após o tratamento com H₂O₂, a análise de expressão gênica mostrou alterações diferenciais para os tempos e linhagens estudadas, assim como variações nos níveis de danos no DNA obtidos pelo Ensaio Cometa. Em todos os pontos da análise em que obtivemos diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) observou-se uma indução do gene analisado, sendo que apenas os genes:

ERN1, *EIF2AK3* e *GADD153* mostraram alterações nos níveis de expressão transcricional, sendo que o gene *TRAF2* não se mostrou modulado significativamente em nenhum dos tempos analisados (Figuras 5, 6 e 7).

Dos três genes induzidos, apenas *GADD153* mostrou níveis de expressão estatisticamente significativos no tempo zero hora para o tratamento com H₂O₂ (Figura 9), no qual os danos no DNA obtiveram os maiores valores. Em 2 horas de pós-tratamento o gene *ERN1* mostrou-se induzido significativamente apenas nas linhagens de fibroblastos, enquanto que a expressão de *GADD153* foi mantida nas células AS405 e U87MG (Figuras 5, 6 e 7). No tempo de 2 h as células GM07492A e U87MG ainda apresentaram níveis de danos significativos ($p < 0,05$), enquanto que as células AS405 se recuperaram completamente em termos de danos no DNA visualizados pelo Ensaio Cometa (Figuras 2, 3 e 4).

Após 4 horas, nenhuma modulação significativa foi observada nas linhagens de fibroblastos, sendo que em ambas os níveis de danos no DNA atingiram níveis próximos ao do controle. No entanto, nas células U87MG, nas quais os danos no DNA foram significativos ($p < 0,05$), observou-se uma indução significativa ($p < 0,05$) para os genes *EIF2AK3* e *GADD153* (Figuras 5, 6 e 7). Para o último tempo de análise, 6 horas pós-tratamento, ambas as linhagens de fibroblastos apresentaram o gene *ERN1* significativamente ($p < 0,05$) induzido; de acordo com o Ensaio Cometa, nenhum dano significativo ($p > 0,05$) foi observado. No caso de U87MG, uma indução significativa foi observada para os genes *EIF2AK3* e *GADD153* (Figuras 5, 6 e 7), enquanto o Ensaio Cometa mostrou ainda a ocorrência de danos no DNA em níveis significativos ($p < 0,05$).

Os resultados do tratamento com a bleomicina foram praticamente semelhantes aos encontrados para o pós-tratamento com H₂O₂. Entretanto, os

níveis de dano no DNA mostraram-se elevados e com diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo de todos os tempos de análise. O tratamento com a bleomicina levou à indução estatisticamente significativa de *ERN1*, *EIF2AK3* e *GADD153* e nenhum efeito para *TRAF2* (Figuras 5, 6 e 7).

Logo após este tratamento, tempo zero hora, observou-se indução gênica com níveis significativos ($p < 0,05$) na linhagem GM07492A para *ERN1* e *GADD153*, enquanto que a outra linhagem de fibroblastos primários (AS405) não apresentou nenhuma modulação transcricional significativa ($p > 0,05$). No caso de células tumorais, linhagem U87MG, apenas *GADD153* se mostrou significativamente induzido (Figuras 5, 6 e 7). De acordo com o Ensaio Cometa, os maiores níveis de dano foram observados para GM07492A, em zero hora, embora as outras linhagens apresentassem valores também elevados. Diferentemente, no tempo 2 horas, nenhum gene com nível de expressão significativo foi observado para a linhagem GM07492A, mas para AS405 e U87MG, o gene *GADD153* foi significativamente induzido ($p < 0,05$) (Figuras 5, 6 e 7). Nesse tempo, GM07492A manteve o nível de dano no DNA elevado enquanto que as outras linhagens apresentaram redução nos mesmos, mas com diferenças significativas ($p < 0,05$).

No tempo de 4 horas de pós-tratamento a indução de *ERN1* e *GADD153* foi elevada para as células GM07492A, não sendo observada modulação estatisticamente significativa para as outras duas linhagens estudadas (Figuras 5, 6 e 7). Nesse tempo, observou-se o mesmo padrão obtido em 2 horas quanto aos níveis de dano no DNA. Já no momento mais tardio de análise, 6 horas, cada linhagem apresentou um único gene induzido significativamente ($p < 0,05$), sendo: *ERN1* para GM07492A, *EIF2AK3* para AS405 e *GADD153* para U87MG (Figuras 5, 6 e 7).

Figura 5 – Perfis de expressão gênica transcricional (obtidos por qPCR em tempo real) apresentados pela linhagem GM07492A tratada com H₂O₂ (30 min e 80 μ M) e Bleomicina (24 h e 30 μ M), em diferentes tempos pós-tratamento. Os resultados de expressão gênica relativa foram obtidos com auxílio do *software* REST 2009 (v2.0.13 – QIAGEN). * : diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre controle e tratamento.

Figura 6 – Perfis de expressão gênica transcricional (obtidos por qPCR em tempo real) apresentados pela linhagem AS405 tratada com H₂O₂ (30 min e 80 μ M) e Bleomicina (24 h e 30 μ M), em diferentes tempos pós-tratamento. Os resultados de expressão gênica relativa foram obtidos com auxílio do *software* REST 2009 (v2.0.13 – QIAGEN). * : diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre controle e tratamento.

Figura 7 – Perfis de expressão gênica transcricional (obtidos por qPCR em tempo real) apresentados pela linhagem U87MG tratada com H₂O₂ (30 min e 80 µM) e Bleomicina (24 h e 30 µM), em diferentes tempos pós-tratamento. Os resultados de expressão gênica relativa foram obtidos com auxílio do *software* REST 2009 (v2.0.13 – QIAGEN). * : diferença estatisticamente significativa (p<0,05) para comparação entre controle e tratamento.

Figura 8 – Perfis de expressão gênica transcricional (obtidos por qPCR em tempo real) para *ERN1* apresentados pelos fibroblastos humanos normais e pelas células de glioblastoma em diferentes tempos pós-tratamento. **A**: tratamento com H_2O_2 (30 min e 80 μ M) e **B**: tratamento com bleomicina (24 h e 30 μ M). Resultados de expressão gênica relativa obtidos com auxílio do *software* REST 2009 (v2.0.13 – QIAGEN). * : diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre controle e tratamento.

Figura 9 – Perfis de expressão gênica transcricional (obtidos por qPCR em tempo real) para *GADD153* apresentados pelos fibroblastos humanos normais e pelas células de glioblastoma em diferentes tempos pós-tratamento. **A**: tratamento com H_2O_2 (30 min e 80 μ M) e **B**: tratamento com bleomicina (24 h e 30 μ M). Resultados de expressão gênica relativa obtidos com auxílio do *software* REST 2009 (v2.0.13 – QIAGEN). * : diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre controle e tratamento.

4.3 - **Expressão protéica por imunofluorescência**

A expressão gênica ao nível protéico foi analisada para duas proteínas relacionadas ao sistema ubiquitina-proteassomo, ERN1 (sinalização de proteínas mal-dobradas no lúmen do RE, desencadeando UPR e apoptose) e GADD153 (inibição da ligação de C/EBP e LAP ao DNA pela formação de heterodímeros que impedem o DNA de se ligar). Essas duas proteínas foram escolhidas após as análises de expressão gênica ao nível transcricional, por serem codificadas por genes que se apresentaram induzidos significativamente ($p < 0,05$) na maioria dos pontos analisados. Após os tratamentos, as análises foram realizadas em quatro diferentes tempos: zero, 2, 4 e 6 horas.

Para a proteína ERN1 observa-se expressão discreta e pontual para os tratamentos e tempos analisados, inclusive nos pontos onde não se observa diferenças estatisticamente significativas nas análises de expressão gênica transcricional. Este fato evidencia um nível protéico basal que condiz com a sua função de sinalizar proteínas mal-dobradas. Ainda, observa-se discreta expressão diferencial entre as linhagens estudadas.

Nota-se expressão na linhagem GM07492A no tratamento com bleomicina no tempo zero de pós-tratamento (Figura 10 A). Não se observou qualquer expressão para a linhagem AS405 independente do tratamento (Figura 10 B). De acordo com a avaliação da expressão gênica transcricional, a linhagem U87MG não apresentou nenhum nível significativo de expressão quando comparado com o controle, mas observa-se expressão da proteína ERN1. Foi observada uma marcação discreta nos pontos: Controle – zero hora, H_2O_2 – zero hora e H_2O_2 – 6 horas pós-tratamento.

Nota-se também uma expressão mais evidente nos pontos: Bleomicina – 2 horas, 4 horas e 6 horas pós-tratamento (Figura 10 C).

Quanto à expressão da proteína GADD153, observa-se expressão evidente em todos os pontos analisados nas linhagens de fibroblastos. Nos controles nota-se a presença da proteína ao redor do núcleo, sendo que nas células tratadas visualizam-se tanto expressão ao redor do núcleo (que em alguns momentos está mais intensa) quanto localizada na região nuclear (Figura 11 A e B).

Nos tempos mais tardios (4 e 6 h pós-tratamento) observa-se expressão mais intensa em relação aos tempos mais recentes (zero e 2 h pós-tratamento) e aos controles (Figura 11 A e B). Quando analisamos os dados de expressão gênica transcricional temos como resultado níveis significativos ($p < 0,05$) nos tempos zero e 2 horas para as linhagens tratadas, sendo que nos tempos tardios praticamente não se observa expressão significativa ($p < 0,05$) (Figura 9).

Já nas células de glioblastoma não se observa expressão nas lâminas controles, mas nota-se nas lâminas de tratamento (Figura 11 C). As marcações nas lâminas tratadas se localizam principalmente na região nuclear e observa-se uma evidente expressão no tratamento com H_2O_2 , nos tempos mais recentes, sendo que ao longo do tempo de pós-tratamento tem-se uma menor expressão. Já para as células tratadas com Bleomicina, tem-se discreta expressão nos pontos zero e 2 horas e nenhuma expressão nos tempos tardios de pós-tratamento (Figura 11 C).

Figura 10 - Expressão da proteína ERN1 detectada por imunofluorescência nas linhagens GM07492A (A) e AS405 (B) tratadas com H₂O₂ (30 min e 80 µM) e Bleomicina (24 h e 30 µM) e U87MG (C) tratada com H₂O₂ (60 min e 400 µM) e Bleomicina (24 h e 30 µM), em diferentes tempos pós-tratamento. Marcação com Alexa 488 (*Invitrogen*) (cor verde) e contra-coloração com DAPI (cor azul) para a visualização do núcleo. Aumento de 800 X.

Figura 11 - Expressão da proteína GADD153 detectada por imunofluorescência nas linhagens GM07492A (A) e AS405 (B) tratadas com H₂O₂ (30 min e 80 μ M) e Bleomicina (24 h e 30 μ M) e U87MG (C) tratada com H₂O₂ (60 min e 400 μ M) e Bleomicina (24 h e 30 μ M), em diferentes tempos pós-tratamento. Marcação com Alexa 488 (*Invitrogen*) (cor verde) e contra-colaração com DAPI (cor azul) para a visualização do núcleo. Aumento de 800 X.

5 - DISCUSSÃO

Muitos genes têm sido indicados como responsivos ao estresse genotóxico, mas ainda não existe confirmação para a maioria deles, visto que muitos fatores influenciam as respostas celulares (incluindo-se o *background* genético, a idade, os tipos de tecidos, entre outros), o que faz com que a busca por marcadores gênicos continue. São ainda escassos estudos sistemáticos direcionados à expressão de genes que possam ser validados como de estresse genotóxico para vários agentes, tais como radiação ionizante e drogas antineoplásicas (bleomicina, cisplatina, temozolomida e etoposido), sendo relevante a confirmação das respostas em diferentes tipos celulares: linfócitos, fibroblastos, linhagens tumorais, sob diferentes níveis e condições de tratamento.

Muitos dos genes associados a agentes genotóxicos pertencem à classe de reparo do DNA e a outras com funções relacionadas; algumas destas têm genes implicados nas respostas ao estresse ao nível de retículo endoplasmático (RE), com funções relacionadas ao sistema ubiquitina-proteassomo (UPS) e UPR (*unfolded-protein response*).

Os organismos eucarióticos apresentam vias de sinalização específicas para assegurar que o retículo endoplasmático mantenha a sua capacidade de atuar no mecanismo de dobramento de proteínas (*folding-protein*), contribuindo para a homeostase. No entanto, sob condições adversas em que são produzidas proteínas alteradas (*unfolded/misfolded-proteins*), ocorre ativação do sistema UPR (*unfolded-protein response*) (Forman *et al.*, 2003), que consiste num processo integrado de transdução de sinal, o qual transmite informações sobre o *status* do lúmen do RE ao

núcleo e aumenta a capacidade de enovelamento protéico. Entretanto, se os mecanismos de adaptação e sobrevivência não forem suficientes para diminuir os níveis de proteínas mal-dobradas, pode ocorrer a indução de apoptose (Hetz, 2009).

São conhecidos muitos fatores que levam ao UPR, como a privação de glicose, mudanças no estado redox, aumento na razão de colesterol, em relação aos fosfolípidos em membranas do RE e depleção do estoque de ATP (Yacoub Wasef *et al.*, 2006, Gomez *et al.*, 2008). O estresse do RE refere-se ao acúmulo de proteínas alteradas ou mal-dobradas fruto de um estresse fisiológico que aumenta a demanda de síntese protéica ou leva à interrupção do dobramento das proteínas (Ron e Walter, 2007, Thomas *et al.*, 2010).

Os subprodutos do enovelamento protéico são eliminados pela Degradação Associada ao RE (DARE), onde as proteínas mal-dobradas são translocadas ao citosol e são degradadas pelo sistema proteassomo (Powers *et al.*, 2009). A sinalização para a via UPR regula genes envolvidos na entrada de proteínas no RE, dobramento, glicosilação, metabolismo redox, autofagia, biogênese e tráfego de vesículas (Hetz, 2009, Bhat e Greer, 2011). Atualmente, esse mecanismo tem sido considerado de grande importância, baseado na evidência do envolvimento do estresse de RE em muitas doenças, como condições neurodegenerativas, câncer, diabetes e inflamação (Matus *et al.*, 2008, Todd *et al.*, 2008).

De um modo geral, a sinalização da via UPR ocorre após o acúmulo de proteínas mal-dobradas dentro do lúmen do RE. Existem pelo menos três sensores de estresse na membrana do RE: ERN1 (IRE1 α), EIF2AK3 (PERK) e ATF6. Em caso de estresse, ocorre a autofosforilação de ERN1, o que medeia o processamento do mRNA de XBP1 (fator de transcrição que regula muitos genes essenciais na via UPR). A proteína ERN1 ativada liga-se à proteína adaptadora

TRAF2, desencadeando a ativação de JNK e da via autofágica. Alternativamente, a ativação de EIF2AK3 fosforila e inibe a tradução do fator iniciador de tradução eIF2 α , diminuindo a síntese protéica e a sobrecarga de proteínas mal-dobradas no RE. Este evento leva à tradução de ATF4, um fator de transcrição que induz a expressão de genes envolvidos na síntese de aminoácidos, resposta antioxidante e reguladores de apoptose (GADD153). Uma terceira via é iniciada por ATF6, que após ser induzida sob estresse de RE, aumenta a expressão de algumas chaperonas e de genes envolvidos no DARE (Hetz e Glimcher, 2009) (Figura 12).

Figura 12 – Sinalização celular em resposta ao estresse no RE e funções biológicas alteradas em cada ramificação da via UPR (modificado de Hetz, 2009).

As respostas celulares a tratamentos químicos e/ou físicos e toxicidade podem ser monitoradas por métodos como os microarranjos de DNA, proteômica e metabolômica. Estes têm facilitado a busca por marcadores gênicos, que têm atraído grande interesse. O contexto em que cada marcador molecular é utilizado

varia de acordo com a natureza do problema biológico a ser tratado (Bailey e Ulrich, 2004).

Há uma grande expectativa de que a descoberta de marcadores gênicos preditivos de toxicidade avançará consideravelmente, podendo, cada perfil transcricional, levar a uma resposta cumulativa representando interações complexas no organismo, incluindo efeitos toxicológicos e farmacológicos. Se essas interações estão significativamente correlacionadas a um efeito e mostram-se reproduzíveis, o perfil transcricional poderá ser classificado como marcador gênico preditivo (Group., 2001).

Alguns marcadores baseados em expressão gênica foram identificados; alguns destes foram relacionados aos efeitos precoces do tabagismo em linfócitos (van Leeuwen *et al.*, 1986); aos efeitos genotóxicos em células de linfoma (Kim *et al.*, 2005); à injúria renal (Amin *et al.*, 2004); e à toxicidade intestinal (Searfoss *et al.*, 2003).

No presente trabalho, foram analisados genes relacionados ao UPS e ao UPR, baseado em resultados de estudos prévios de nosso laboratório, envolvendo genes modulados após o estresse genotóxico utilizando a técnica de expressão gênica em larga escala (Cardoso *et al.*, 2002, Sakamoto-Hojo *et al.*, 2003a, Fachin *et al.*, 2007a, Fachin *et al.*, 2009a). O objetivo consistiu em buscar marcadores gênicos de estresse genotóxico para uma série de genes já indicados como responsivos ao estresse, visando a confirmação dessas respostas em dois tipos celulares (fibroblastos humanos e células de glioblastoma) sob diferentes tratamentos (peróxido de hidrogênio e bleomicina).

Ambos os tratamentos empregados nos testes com linhagens celulares apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) no tempo zero hora para o Ensaio

Cometa, demonstrando que o tratamento foi capaz de causar danos às células. Os danos causados apresentaram níveis significativamente aumentados, com valores variáveis dependendo da linhagem celular estudada (Figuras 2, 3 e 4). Além disso, observa-se que dependendo do tratamento e do tempo de recuperação analisado (até 6 h), as células se mostraram mais ou menos capazes de promover a recuperação do dano inicial sofrido. Uma provável explicação para essa resposta diferencial provavelmente se deve ao *background* genético de cada linhagem e, ainda, ao tipo de dano gerado por cada droga empregada. Isto se reflete na sensibilidade ao tratamento e na cinética de reparo desses danos para cada linhagem.

Outra evidência de que o tratamento do presente trabalho foi capaz de causar dano nas células (estresse genotóxico) é a indução significativa apresentada pelo gene *GADD153*. De acordo com a literatura, a ativação desse gene pode ser um demonstrativo da real indução de estresse genotóxico no RE, já que genes da família *GADD* (*GADD34*, *GADD45* e *GADD153*) são induzidos por estresse genotóxico e sinais de parada do ciclo celular. Foi demonstrado que *GADD153* pode ativar genes que defendem a secreção de proteína em curso durante o estresse do RE, um dos quais é o *GADD34* (Marciniak *et al.*, 2004).

Os presentes resultados mostraram um nível de dano significativo no tempo zero hora para as duas drogas utilizadas em todas as linhagens testadas, com valores entre 45% e 75% (Figuras 2, 3 e 4). No tempo de 6 h pós-tratamento, houve recuperação nas linhagens de fibroblastos apenas para H_2O_2 , atingindo valores próximos ao controle (Figura 2 e 3), enquanto que a linhagem U87MG apresentou recuperação apenas para o tratamento com Bleomicina, mantendo níveis de dano elevados (Figura 4).

Nas análises de expressão gênica transcricional por PCR em tempo real, obtiveram-se variações na modulação (indução/repressão) para os genes estudados nas linhagens de fibroblastos e de glioblastoma após o tratamento com H₂O₂ e Bleomicina (Figuras 5, 6 e 7). A análise forneceu como resultado três genes modulados significativamente ($p < 0,05$), sendo: *ERN1*, *EIF2AK3* e *GADD153*. Destes, *ERN1* e *GADD153*, receberam maior atenção nas discussões por se apresentarem induzidos em maior quantidade de pontos analisados.

Como já discutido anteriormente e de acordo com Hetz (2009), temos três principais proteínas sensoras para estresse no RE, sendo elas: ERN1, EIF2AK3 e ATF6. A proteína ERN1 atua como sensora do acúmulo de proteínas mal-dobradas no lúmen do RE; ao ser ativada, ocorre a oligomerização e autofosforilação da mesma. O resultado dos produtos clivados pela ERN1 inclui domínios quinase e nuclease, que são transportados para o núcleo, onde podem atuar como endonucleases sítio-específicas (Niwa *et al.*, 1999). (Urano *et al.*, 2000), demonstraram que ERN1 ativa genes em resposta ao estresse do RE e também ativa JNK, via ligação com a proteína TRAF2 (proteína adaptadora que liga receptores de membrana a ativação de JNK). De maneira diferente no presente trabalho não se observou a modulação significativa ($p < 0,05$) do gene *TRAF2* em nenhum dos tempos analisados (Figuras 5, 6 e 7).

Em outro estudo, Hetz *et al.*, (2006) concluíram que BAX e BAK (proteínas pro-apoptóticas) atuam na membrana do RE ativando a sinalização de IRE1 α , fornecendo uma ligação entre os membros do núcleo da via apoptótica e UPR. O gene *GADD153* tem forte ligação com a via apoptótica e assim, como no trabalho de Hetz *et al.* (2006) este gene se mostrou induzido no presente trabalho para os tratamentos empregados (Figuras 5, 6 e 7). Já o trabalho de Oikawa *et al.*, (2009)

confirma a dependência da dissociação de BiP para a regulação e ativação de IRE1 α em células de mamíferos ao invés da simples interação direta com proteínas mal-dobradas necessária para a ativação em leveduras.

No presente trabalho, a análise de expressão gênica (qPCR em tempo real) para o gene *ERN1* mostrou que este foi significativamente induzido em relação ao controle (Figura 8).

Para o tratamento com H₂O₂ houve indução significativa somente nas linhagens de fibroblastos analisadas, sendo que ocorreram nos tempos 2 e 6 h pós-tratamento. Nesse tratamento, *ERN1* apresentou uma resposta semelhante para as linhagens de fibroblastos, enquanto que não apresentou modulação significativa para as células de U87MG (Figura 8 A). Essa falta de modulação sugere uma via de sinalização de estresse do RE diferente daquela utilizada pelos fibroblastos estudados no presente trabalho. Nas células U87MG observou-se uma indução significativa do gene *EIF2AK3* nos tempos 4 e 6 h, evidenciando a indução de outra via de sinalização de UPR para esta linhagem (Figura 7).

Quando analisamos os dados de expressão gênica de *ERN1* após tratamento com a droga bleomicina, não se observou um nível estatisticamente significativo de aumento na expressão desse gene. Entre as linhagens analisadas, apenas GM07492A mostrou a indução do gene *ERN1*, que ocorreu nos tempos zero, 4 e 6 h pós-tratamento (Figura 8 B). Estes resultados sugerem novamente a indução de vias alternativas na sinalização de estresse do RE nas outras linhagens estudadas. Para esse tratamento com a bleomicina, houve também a indução significativa de *EIF2AK3* nas células AS405 no tempo de 6 h de pós-tratamento (Figura 6), enquanto que não houve alteração significativa na expressão desses dois genes na linhagem U87MG (Figura 7).

O gene *ERN1* também foi recentemente analisado em outros trabalhos do presente grupo de pesquisa, no qual o mesmo se mostrou diferencialmente expresso em diversos tipos celulares expostos a agentes genotóxicos.

Em um destes trabalhos, foi analisada a expressão gênica em fibroblastos humanos normais (linhagem FHN) após a irradiação com raios-gama (dose de 4 Gy e taxa de 2 Gy/min). Nesse trabalho, *ERN1* foi induzido em 6 h de pós-tratamento, de forma semelhante à do presente trabalho, no qual as linhagens de fibroblastos também apresentaram indução significativa ($p < 0,05$) neste mesmo tempo para dois diferentes agentes genotóxicos (Figura 8).

Em outro trabalho do grupo, a expressão de *ERN1* foi analisada em células U87MG após tratamento com três drogas: Doxorubicina (0,15 µg/ml), Cisplatina (25 µM) e Temozolomida (200 µM). Observou-se a indução do mesmo para os tratamentos com Doxorubicina e Cisplatina e uma pequena repressão para Temozolomida em 6 h de pós-tratamento. Novamente, os perfis de expressão desse gene foram obtidos após estresse genotóxico, mas estes foram diferentes dos obtidos no presente trabalho, já que a linhagem de glioblastoma não apresentou alteração significativa nos níveis de expressão do gene *ERN1* após tratamento com H_2O_2 e Bleomicina (Figura 8).

Nas células, o RE é a organela citoplasmática responsável pela síntese e dobramento das proteínas destinadas à secreção, às membranas celulares, ao Complexo de Golgi, aos lisossomos etc. Essas proteínas possuem conformações próprias que permitem a realização de suas funções celulares de modo correto. No entanto, o dobramento protéico é afetado em várias condições fisiológicas e patológicas, denominado “Estresse do RE” (Oyadomari e Mori, 2004). Este se caracteriza por elevados níveis de proteínas mal-dobradas. Para superar esta

condição a organela possui vias de sinalização específicas, as vias de resposta ao estresse do RE, que envolvem quatro respostas diferenciais.

A primeira resposta é a diminuição da síntese protéica, prevenindo o aumento da concentração de proteínas mal-dobradas no lúmen do RE. A segunda é a indução transcricional de genes codificadores de proteínas chaperonas que aumentam a capacidade de dobramento da organela. A terceira resposta é também uma indução transcricional, mas de genes ligados ao DARE (Degradação Associada ao RE), na qual as proteínas mal-dobradas são translocadas ao citosol e são degradadas pelo sistema proteassomo. A quarta é a indução de apoptose para eliminar as células danificadas pelo estresse e garantir a sobrevivência do organismo (Yoshida, 2007). Oyadomari (2004) propôs um esquema envolvendo as quatro principais respostas ao estresse do RE, conforme ilustrado na Figura 13, com adaptação para o Português.

Figura 13 - Esquema ilustrativo das respostas ao Estresse do RE. Na fase inicial ocorre a diminuição da síntese protéica. Na fase seguinte vários grupos de genes são induzidos transcricionalmente. As chaperonas são primeiro induzidas para redobrar as proteínas mal-dobradas; caso sejam insuficientes, os componentes do DARE são induzidos para eliminar as proteínas mal-dobradas. Se o estresse do RE persistir, vias de sinalização apoptóticas são ativadas, com a indução de GADD153 e ativação de JNK e Caspase-12. A decisão entre sobrevivência ou apoptose depende do balanço entre os sinais de sobrevivência e sinais de apoptose (modificado de Oyadomari, 2007).

Na quarta resposta ao estresse do RE temos a indução ou ativação de vários genes, dentre eles *GADD153*. Este faz parte de uma família gênica que engloba três genes distintos: *GADD34*, *GADD54* e *GADD153*. Os genes *GADD* são induzidos por estresse genotóxico e sinais de parada no crescimento e sua expressão sobre esta condição são regulados de acordo com a proporção do nível de células mortas por apoptose (Cho *et al.*, 2009). O *GADD153* atua como um mediador central para a apoptose induzida pelo estresse do RE.

A proteína *GADD153* é expressa em níveis muito baixos, mas em situações que induzem estresse a sua expressão torna-se elevada em uma ampla variedade de células. Encontra-se no citoplasma em condições normais, mas apresenta grande

acúmulo e recrutamento para o núcleo em condições de estresse. Sua elevada expressão é interpretada como forte evidência de estresse genotóxico, principalmente ao nível do RE, já que o tratamento de células com conhecidos indutores (tunicamicina, *thapsigargin* e *dithiothreitol*) deste tipo de estresse apresenta níveis elevados de expressão de GADD153. Além disso, recentes estudos utilizando microarranjos mostram que *GADD153* é um dos genes mais induzidos durante o estresse do RE (Oyadomari e Mori, 2004, Tan *et al.*, 2008).

O presente trabalho indica a ocorrência de estresse ao nível de RE, com base nos altos níveis significativos ($p < 0,05$) de indução do gene *GADD153* após os tratamentos realizados (Figuras 5, 6 e 6) e a presença de forte marcação nas lâminas de imunofluorescência para ambos os tratamentos, principalmente para os fibroblastos (Figura 11).

Os dados da análise de expressão do gene *GADD153* mostraram a sua indução transcricional no tempo zero hora para as três linhagens estudadas, após tratamento com H_2O_2 . Este gene atua em diversos processos biológicos (dimerização protéica, ligação de DNA em locais específicos, ciclo celular, resposta a drogas etc) como fator de transcrição, o que pode justificar a sua indução imediata no tempo zero hora (Marciniak *et al.*, 2004). Essa indução continuou após 2 h para as linhagens AS405 e U87MG, mas nos tempos de 4 e 6 h pós-tratamento, apenas U87MG apresentou níveis de expressão significativos ($p < 0,05$) (Figura 9 A). Essa diferença quanto à indução em todos os tempos de análise para U87MG deve-se provavelmente ao seu *background* genético, que influencia sobremaneira as respostas aos agentes genotóxicos (Figuras 4 e 9 A).

Diferentemente do observado para o tratamento com H_2O_2 , o tratamento com a Bleomicina não alterou significativamente ($p > 0,05$) os níveis de expressão nas três

linhagens estudadas no tempo zero (Figura 9 B), sendo que apenas GM07492A mostrou indução de *GADD153* neste tempo. Entretanto, os dados do Ensaio Cometa mostraram que a Bleomicina causou elevados níveis de danos ($p < 0,05$) ao longo de todos os tempos pós-tratamento para as linhagens. A indução do gene *GADD153* variou um pouco ao longo dos tempos analisados e do tipo de linhagem (Figura 9). Por exemplo, houve indução em 2 h para AS405 e U87MG, para GM07492A em 4 h e para U87MG em 6 h (Figura 9).

Assim como o *ERN1*, o gene *GADD153* também foi analisado em outros trabalhos (ainda não publicados) do presente grupo de pesquisa, nos quais se observou uma modulação diferencial em diversos tipos celulares submetidos a estresse genotóxico.

Sob irradiação com raios-gama, fibroblastos primários apresentaram indução de *GADD153* no tempo de 6 h após irradiação com 4 Gy (taxa de 0,5 Gy/min). No presente trabalho, também se observou indução para as linhagens de fibroblastos submetidas a tratamento com o peróxido de hidrogênio (zero e 2 h) e bleomicina (zero, 2 e 4 h), mas não de modo significativo para 6 h.

Adicionalmente, em outro trabalho do grupo de pesquisa (dados não publicados), foi analisada a expressão gênica para células U87MG após tratamento com três quimioterápicos: Doxorubicina (0,15 µg/ml), Cisplatina (25 µM) e Temozolomida (200 µM). O padrão observado foi de total indução do gene *GADD153* para as três drogas em 6 h e também 24 h de pós-tratamento. Esse resultado também foi obtido no presente trabalho, havendo indução significativa ($p < 0,05$) para os dois agentes utilizados no tempo de 6 h pós-tratamento.

No presente trabalho, a expressão protéica desse gene foi analisada por imunofluorescência, sendo demonstrado que a proteína *GADD153* apresentou uma

expressão evidente em todos os controles das linhagens de fibroblastos ao longo de todos os tempos pós-tratamento (Figura 11). As marcações se localizaram ao redor do núcleo e mostraram um nível basal desta proteína nas linhagens de fibroblastos primários. Porém, a linhagem tumoral U87MG não apresentou nenhum padrão de marcação evidente nas lâminas controles, mas apenas nas lâminas de tratamento (Figura 11 A, B e C). Assim como observado para a expressão gênica transcricional após o tratamento com H_2O_2 , foi observada forte expressão protéica, principalmente para as linhagens de fibroblastos. Entretanto, no tratamento com Bleomicina, as linhagens de fibroblastos apresentam marcações ao longo de todos os tempos, o que difere das análises de expressão gênica transcricional. Os dados de expressão protéica confirmam, portanto, a modulação de GADD153 para este tratamento.

Assim, as alterações nos perfis de expressão gênica observadas para os genes estudados são compatíveis com a indução de danos observados no DNA pelo Ensaio Cometa, indicando o envolvimento do UPS nas respostas celulares ao estresse oxidativo, visto que os genes estudados apresentam funções importantes nesse mecanismo. Esses dados são condizentes com os resultados anteriormente obtidos no laboratório, os quais demonstram alterações nos perfis transcricionais dos genes *ERN1* e *GADD153* após tratamento com drogas antitumorais e radiações ionizantes em linhagens de fibroblastos humanos (normais) e glioblastoma. Em conjunto, os resultados estimulam uma avaliação mais detalhada desses genes como marcadores de resposta ao estresse e evidencia a sua importância no cenário da via UPS. Assim, as alterações observadas nos perfis de expressão de genes da via UPS demonstraram a importância do estresse genotóxico ao nível do retículo endoplasmático.

6 – CONCLUSÕES

- Os tratamentos com H_2O_2 e bleomicina, empregados nas linhagens de fibroblastos e de glioblastoma, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) no tempo zero hora (sem recuperação), demonstrando que o tratamento foi eficaz na indução de danos às células, gerando estresse genotóxico, com valores entre 50% e 75%, dependendo da linhagem celular.
- Foi observado que dependendo do tratamento as células se mostraram mais capazes (linhagens GM07492A e AS405 após tratamento com H_2O_2) ou menos capazes (todas as linhagens estudadas após tratamento com bleomicina) de se recuperarem dos danos iniciais sofridos, analisados até 6 h, demonstrando uma diferença na sensibilidade das linhagens celulares aos tratamentos.
- A análise de expressão gênica em tempo real mostrou que ambos os tratamentos induziram, de modo geral, os genes *ERN1*, *EIF2AK3* e *GADD153* nas linhagens estudadas.
- A linhagem de fibroblasto GM07492A apresentou indução dos genes *ERN1* e *GADD153* após tratamento tanto com H_2O_2 quanto com bleomicina. A indução para H_2O_2 foi mais precoce (zero e 2 h) enquanto que para bleomicina ocorreu praticamente ao longo de todo o tempo de pós-tratamento.
- A linhagem de fibroblasto AS405 sofreu indução de *ERN1* e *GADD153* para o tratamento com H_2O_2 enquanto que para bleomicina foram induzidos os genes *EIF2AK3* e *GADD153*. O tratamento com H_2O_2 causou indução

principalmente nos tempos zero e 2 h, mas o mesmo não foi observado para a bleomicina.

- Na linhagem U87MG, a indução de *EIF2AK3* ocorreu de modo tardio após tratamento com H_2O_2 , enquanto que *GADD153* esteve induzido após ambos os tratamentos durante todo o tempo de análise. De modo diferente do observado para as linhagens de fibroblastos, a falta de indução de *ERN1* para a U87MG sugere uma via diferente de sinalização. Isso porque há indução de *EIF2AK3* no tempo de 4 h após tratamento com H_2O_2 .
- O nível de expressão da proteína ERN1 foi moderado e pontual, inclusive nos pontos onde não houve indução gênica. Este fato evidencia um nível protéico basal que condiz com a sua função sinalizadora de proteínas mal-dobradas. Ainda, observa-se discreta expressão diferencial entre as linhagens. Nota-se expressão em GM07492A no tratamento com bleomicina no tempo zero, diferentemente de AS405. Quanto à linhagem U87MG, a proteína ERN1 não foi induzida pelo tratamento com H_2O_2 , mas sim pelo tratamento com a bleomicina (2, 4 e 6 horas de recuperação).
- Quanto à proteína GADD153, observou-se nas linhagens de fibroblastos uma expressão evidente em todos os tempos analisados, confirmando a sua expressão. Interessantemente, nos controles, observa-se uma expressão basal ao redor do núcleo, enquanto que as células tratadas mostraram uma expressão não só ao redor do núcleo quanto intranuclear. Por outro lado, a linhagem U87MG mostrou expressão de GADD153 apenas nas células tratadas, localizadas na região nuclear, sendo mais evidentes para o

tratamento com H_2O_2 ; para a bleomicina, observou-se uma discreta expressão.

- Assim, as alterações nos perfis de expressão gênica observadas para os genes estudados são compatíveis com a indução de danos observados no DNA pelo Ensaio Cometa, indicando o envolvimento dos genes envolvidos no sistema UPS nas respostas celulares ao estresse genotóxico. Em conjunto, os resultados estimulam uma avaliação mais detalhada desses genes como marcadores de resposta ao estresse e evidencia a sua importância no cenário da via UPS.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-HAKIM, A., ESCRIBANO-DIAZ, C., LANDRY, M. C., O'DONNELL, L., PANIER, S., SZILARD, R. K. & DUROCHER, D. 2010. The ubiquitous role of ubiquitin in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*, 9, 1229-40.
- AMIN, R., VICKERS, A., SISTARE, F., THOMPSON, K., ROMAN, R., LAWTON, M., KRAMER, J., HAMADEH, H., COLLINS, J., GRISSOM, S., BENNETT, L., TUCKER, C., WILD, S., KIND, C., OREFFO, V., DAVIS, J. N., CURTISS, S., NACIFF, J., CUNNINGHAM, M., TENNANT, R., STEVENS, J., CAR, B., BERTRAM, T. & AFSHARI, C. 2004. Identification of putative gene based markers of renal toxicity. *Environ Health Perspect*, 112, 465-79.
- BAILEY, W. & ULRICH, R. 2004. Molecular profiling approaches for identifying novel biomarkers. *Expert Opin Drug Saf*, 3, 137-51.
- BASSI, C., MELLO, S., CARDOSO, R., GODOY, P., FACHIN, A., JUNTA, C., SANDRIN-GARCIA, P., CARLOTTI, C., FALCAO, R., DONADI, E., PASSOS, G. & SAKAMOTO-HOJO, E. 2008. Transcriptional changes in U343 MG-a glioblastoma cell line exposed to ionizing radiation. *Hum Exp Toxicol*, 27, 919-29.
- BHAT, K. P. & GREER, S. F. 2011. Proteolytic and non-proteolytic roles of ubiquitin and the ubiquitin proteasome system in transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1809, 150-5.
- BHAUMIK, S. R. & MALIK, S. 2008. Diverse regulatory mechanisms of eukaryotic transcriptional activation by the proteasome complex. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 43, 419-33.
- BI, M., NACZKI, C., KORITZINSKY, M., FELLS, D., BLAIS, J., HU, N., HARDING, H., NOVOA, I., VARIA, M., RALEIGH, J., SCHEUNER, D., KAUFMAN, R. J., BELL, J., RON, D., WOUTERS, B. G. & KOUMENIS, C. 2005. ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *Embo J*, 24, 3470-81.
- CARDOSO, R., ESPANHOL, A., PASSOS, G. & SAKAMOTO-HOJO, E. 2002. Differential gene expression in gamma-irradiated BALB/3T3 fibroblasts under the influence of 3-aminobenzamide, an inhibitor of parp enzyme. *Mutat Res*, 508, 33-40.
- CARMINATI, P. O., MELLO, S. S., FACHIN, A. L., JUNTA, C. M., SANDRIN-GARCIA, P., CARLOTTI, C. G., DONADI, E. A., PASSOS, G. A. & SAKAMOTO-HOJO, E. T. 2010.

- Alterations in gene expression profiles correlated with cisplatin cytotoxicity in the glioma U343 cell line. *Genet Mol Biol*, 33, 159-68.
- CHEN, J., GHORAI, M., KENNEY, G. & STUBBE, J. 2008. Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage. *Nucleic Acids Res*, 36, 3781-90.
- CHEN, J. & STUBBE, J. 2004. Bleomycins: new methods will allow reinvestigation of old issues. *Curr Opin Chem Biol*, 8, 175-81.
- CHEN, J. & STUBBE, J. 2005. Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer*, 5, 102-12.
- CHEN, X. & YIN, X. M. 2011. Coordination of autophagy and the proteasome in resolving endoplasmic reticulum stress. *Vet Pathol*, 48, 245-53.
- CHO, Y. M., JANG, Y. S., JANG, Y. M., CHUNG, S. M., KIM, H. S., LEE, J. H., JEONG, S. W., KIM, I. K., KIM, J. J., KIM, K. S. & KWON, O. J. 2009. Induction of unfolded protein response during neuronal induction of rat bone marrow stromal cells and mouse embryonic stem cells. *Exp Mol Med*, 41, 440-52.
- COUX, O., TANAKA, K. & GOLDBERG, A. L. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem*, 65, 801-47.
- FACHIN, A., MELLO, S., SANDRIN-GARCIA, P., JUNTA, C., DONADI, E., PASSOS, G. & SAKAMOTO-HOJO, E. 2007a. Gene expression profiles in human lymphocytes irradiated in vitro with low doses of gamma rays. *Radiat Res*, 168, 650-65.
- FACHIN, A., MELLO, S., SANDRIN-GARCIA, P., JUNTA, C., GHILARDI-NETTO, T., DONADI, E., PASSOS, G. & SAKAMOTO-HOJO, E. 2009a. Gene expression profiles in radiation workers occupationally exposed to ionizing radiation. *J Radiat Res (Tokyo)*, 50, 61-71.
- FACHIN, A. L., MELLO, S. S., SANDRIN-GARCIA, P., JUNTA, C. M., DONADI, E. A., PASSOS, G. A. & SAKAMOTO-HOJO, E. T. 2007b. Gene expression profiles in human lymphocytes irradiated in vitro with low doses of gamma rays. *Radiat Res*, 168, 650-65.
- FACHIN, A. L., MELLO, S. S., SANDRIN-GARCIA, P., JUNTA, C. M., GHILARDI-NETTO, T., DONADI, E. A., PASSOS, G. A. & SAKAMOTO-HOJO, E. T. 2009b. Gene expression profiles in radiation workers occupationally exposed to ionizing radiation. *J Radiat Res (Tokyo)*, 50, 61-71.

- FORMAN, M. S., LEE, V. M. & TROJANOWSKI, J. Q. 2003. 'Unfolding' pathways in neurodegenerative disease. *Trends Neurosci*, 26, 407-10.
- GOMEZ, E., POWELL, M., BEVINGTON, A. & HERBERT, T. 2008. A decrease in cellular energy status stimulates PERK-dependent eIF2alpha phosphorylation and regulates protein synthesis in pancreatic beta-cells. *Biochem J*, 410, 485-93.
- GROUP., B. D. W. 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*, 69, 89-95.
- HETZ, C. 2009. The UPR as a survival factor of cancer cells: More than folding proteins? *Leuk Res*, 33, 880-2.
- HETZ, C., BERNASCONI, P., FISHER, J., LEE, A., BASSIK, M., ANTONSSON, B., BRANDT, G., IWAKOSHI, N., SCHINZEL, A., GLIMCHER, L. & KORSMEYER, S. 2006. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science*, 312, 572-6.
- HETZ, C. & GLIMCHER, L. 2009. Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1alpha interactome. *Mol Cell*, 35, 551-61.
- HOCHSTRASSER, M. 1996. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet*, 30, 405-39.
- KAUSHIK, S. & CUERVO, A. M. 2006. Autophagy as a cell-repair mechanism: activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Aspects Med*, 27, 444-54.
- KIM, I., XU, W. & REED, J. C. 2008. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 7, 1013-30.
- KIM, J., KWON, J., KIM, J., KOH, W., CHUNG, M., YOON, S., SONG, C. & LEE, M. 2005. Identification of potential biomarkers of genotoxicity and carcinogenicity in L5178Y mouse lymphoma cells by cDNA microarray analysis. *Environ Mol Mutagen*, 45, 80-9.
- LIMP-FOSTER, M. & KELLEY, M. 2000. DNA repair and gene therapy: implications for translational uses. *Environ Mol Mutagen*, 35, 71-81.
- MARCINIAK, S., YUN, C., OYADOMARI, S., NOVOA, I., ZHANG, Y., JUNGREIS, R., NAGATA, K., HARDING, H. & RON, D. 2004. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev*, 18, 3066-77.
- MATTOS, L. S., K.; BRAZ, A. D.; FERNANDES, J. R. 2003. Hydrogen peroxide: importance and determination. *Quim. Nova*, 26.

- MATUS, S., LISBONA, F., TORRES, M., LEÓN, C., THIELEN, P. & HETZ, C. 2008. The stress rheostat: an interplay between the unfolded protein response (UPR) and autophagy in neurodegeneration. *Curr Mol Med*, 8, 157-72.
- MELLO, S. 2006. *Mecanismos de resposta às lesões no DNA induzidas pela cisplatina e radiação ionizante em células humanas* Doutorado Tese, Universidade de São Paulo.
- NAGATSU, T. & SAWADA, M. 2006. Cellular and molecular mechanisms of Parkinson's disease: neurotoxins, causative genes, and inflammatory cytokines. *Cell Mol Neurobiol*, 26, 781-802.
- NIWA, M., SIDRAUSKI, C., KAUFMAN, R. & WALTER, P. 1999. A role for presenilin-1 in nuclear accumulation of Ire1 fragments and induction of the mammalian unfolded protein response. *Cell*, 99, 691-702.
- OIKAWA, D., KIMATA, Y., KOHNO, K. & IWAWAKI, T. 2009. Activation of mammalian IRE1 α upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins. *Exp Cell Res*, 315, 2496-504.
- ORFORD, J., BARKER, A., THONELL, S., KING, P. & MURPHY, J. 1995. Bleomycin therapy for cystic hygroma. *J Pediatr Surg*, 30, 1282-7.
- OYADOMARI, S. & MORI, M. 2004. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*, 11, 381-9.
- PAUL, S. 2008. Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in multiple disease conditions: therapeutic approaches. *Bioessays*, 30, 1172-84.
- PERVAN, M., IWAMOTO, K. S. & MCBRIDE, W. H. 2005. Proteasome structures affected by ionizing radiation. *Mol Cancer Res*, 3, 381-90.
- PFAFFL, M., HORGAN, G. & DEMPFL, L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 30, e36.
- POWERS, E., MORIMOTO, R., DILLIN, A., KELLY, J. & BALCH, W. 2009. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem*, 78, 959-91.
- RAMIREZ, A., HEIMBACH, A., GRUNDEMANN, J., STILLER, B., HAMPSHIRE, D., CID, L. P., GOEBEL, I., MUBAIDIN, A. F., WRIEKAT, A. L., ROEPER, J., AL-DIN, A., HILLMER, A. M., KARSAK, M., LISS, B., WOODS, C. G., BEHRENS, M. I. &

- KUBISCH, C. 2006. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet*, 38, 1184-91.
- RAMOS, C. H. & FERREIRA, S. T. 2005. Protein folding, misfolding and aggregation: evolving concepts and conformational diseases. *Protein Pept Lett*, 12, 213-22.
- RAMOTAR, D. & WANG, H. 2003. Protective mechanisms against the antitumor agent bleomycin: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 43, 213-24.
- RON, D. & WALTER, P. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 519-29.
- SAKAMOTO-HOJO, E., MELLO, S., PEREIRA, E., FACHIN, A., CARDOSO, R., JUNTA, C., SANDRIN-GARCIA, P., DONADI, E. & PASSOS, G. 2003a. Gene expression profiles in human cells submitted to genotoxic stress. *Mutat Res*, 544, 403-13.
- SAKAMOTO-HOJO, E. T., MELLO, S. S., PEREIRA, E., FACHIN, A. L., CARDOSO, R. S., JUNTA, C. M., SANDRIN-GARCIA, P., DONADI, E. A. & PASSOS, G. A. 2003b. Gene expression profiles in human cells submitted to genotoxic stress. *Mutat Res*, 544, 403-13.
- SEARFOSS, G., JORDAN, W., CALLIGARO, D., GALBREATH, E., SCHIRTZINGER, L., BERRIDGE, B., GAO, H., HIGGINS, M., MAY, P. & RYAN, T. 2003. Adipsin, a biomarker of gastrointestinal toxicity mediated by a functional gamma-secretase inhibitor. *J Biol Chem*, 278, 46107-16.
- TAI, H. C. & SCHUMAN, E. M. 2008. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci*, 9, 826-38.
- TAN, Y. Y., ZHOU, H. Y., WANG, Z. Q. & CHEN, S. D. 2008. Endoplasmic reticulum stress contributes to the cell death induced by UCH-L1 inhibitor. *Mol Cell Biochem*, 318, 109-15.
- TANAKA, K. 2009. The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 85, 12-36.
- THOMAS, S. E., DALTON, L. E., DALY, M. L., MALZER, E. & MARCINIAK, S. J. 2010. Diabetes as a disease of endoplasmic reticulum stress. *Diabetes Metab Res Rev*, 26, 611-21.
- TING, J. & LEE, A. S. 1988. Human gene encoding the 78,000-dalton glucose-regulated protein and its pseudogene: structure, conservation, and regulation. *Dna*, 7, 275-86.
- TODD, D., LEE, A. & GLIMCHER, L. 2008. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, 8, 663-74.

- URANO, F., WANG, X., BERTOLOTTI, A., ZHANG, Y., CHUNG, P., HARDING, H. & RON, D. 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, 287, 664-6.
- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T., MAZUR, M. & TELSER, J. 2006. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 44-84.
- VAN LEEUWEN, A., SCHRIER, P., GIPHART, M., NOORDERMEER, I., RUITER, D., RUBINSTEIN, P. & VAN ROOD, J. 1986. TCA: a polymorphic genetic marker in leukemias and melanoma cell lines. *Blood*, 67, 1139-42.
- VARSHAVSKY, A. 2005. Regulated protein degradation. *Trends Biochem Sci*, 30, 283-6.
- VIG, B. & LEWIS, R. 1978. Genetic toxicology of bleomycin. *Mutat Res*, 55, 121-45.
- YACOUN WASEF, S., ROBINSON, K., BERKAW, M. & BUSE, M. 2006. Glucose, dexamethasone, and the unfolded protein response regulate TRB3 mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291, E1274-80.
- YOSHIDA, H. 2007. ER stress and diseases. *FEBS J*, 274, 630-58.

8 - ANEXOS

Anexo A – Tabelas de dados do Ensaio Cometa

TABELA 3 - Dados brutos do Ensaio Cometa – Valores (média $\pm$ desvio-padrão) de porcentagem de DNA na cauda para GM07492A

tempo pós-tratamento (horas)	GM07492A			
	Controle	H ₂ O ₂	Controle	Bleomicina
zero	9,23 $\pm$ 0,52	74,86 $\pm$ 6,38	7,84 $\pm$ 2,13	69,57 $\pm$ 7,56
2	8,48 $\pm$ 2,43	23,02 $\pm$ 7,13	6,37 $\pm$ 0,48	50,66 $\pm$ 5,33
4	6,62 $\pm$ 2,83	12,97 $\pm$ 2,81	7,55 $\pm$ 0,94	37,54 $\pm$ 10,74
6	7,7 $\pm$ 2,59	9,27 $\pm$ 2,97	7,79 $\pm$ 2,7	29,95 $\pm$ 4,71

TABELA 4 - Dados brutos do Ensaio Cometa – Valores (média $\pm$ desvio-padrão) de porcentagem de DNA na cauda para AS405

tempo pós-tratamento (horas)	AS405			
	Controle	H ₂ O ₂	Controle	Bleomicina
zero	7,39 $\pm$ 1,69	49,87 $\pm$ 6,39	6,07 $\pm$ 0,98	48,61 $\pm$ 10,96
2	7,41 $\pm$ 2,92	12,88 $\pm$ 2,51	6,18 $\pm$ 0,33	23,03 $\pm$ 8,7
4	7,24 $\pm$ 1,32	10,74 $\pm$ 2,46	7,04 $\pm$ 1,87	20,38 $\pm$ 11,54
6	8,67 $\pm$ 3,48	8,01 $\pm$ 2,53	8,38 $\pm$ 2,04	18,91 $\pm$ 6,59

TABELA 5 - Dados brutos do Ensaio Cometa – Valores (média $\pm$ desvio-padrão) de porcentagem de DNA na cauda para U87MG

tempo pós-tratamento (horas)	U87MG			
	Controle	H ₂ O ₂	Controle	Bleomicina
zero	6,95 $\pm$ 1,3	57,69 $\pm$ 9,9	7,71 $\pm$ 1,0	44,28 $\pm$ 13,38
2	5,85 $\pm$ 0,8	38,96 $\pm$ 9,2	6,21 $\pm$ 1,06	30,59 $\pm$ 3,34
4	7,84 $\pm$ 1,9	31,74 $\pm$ 4,2	7,14 $\pm$ 3,57	31,06 $\pm$ 6,97
6	7,69 $\pm$ 1,3	19,1 $\pm$ 6,3	7,69 $\pm$ 2,75	24,81 $\pm$ 10,61

ANEXO B – Tabelas de dados de expressão gênica transcricional

TABELA 6 - Dados brutos da expressão gênica transcricional (qPCR em tempo real) – Valores (log2) do nível de expressão para a linhagem GM07492A

GM07492A								
tempo pós- tratamento (horas)	H ₂ O ₂				Bleomicina			
	<i>ERN1</i>	<i>EIF2AK3</i>	<i>GADD153</i>	<i>TRAF2</i>	<i>ERN1</i>	<i>EIF2AK3</i>	<i>GADD153</i>	<i>TRAF2</i>
zero	0.21	-1.02	1.90	0.05	1.38	0.55	1.24	-0.16
2	1.92	0.21	1.22	0.26	0.77	0.53	1.91	-1.19
4	0.90	-0.85	0.21	-0.42	2.62	1.63	1.92	0.52
6	2.11	0.33	1.13	0.64	2.18	1.08	1.69	-0.39

TABELA 7 - Dados brutos da expressão gênica transcricional (qPCR em tempo real) – Valores (log2) do nível de expressão para a linhagem AS405

AS405								
tempo pós- tratamento (horas)	H ₂ O ₂				Bleomicina			
	<i>ERN1</i>	<i>EIF2AK3</i>	<i>GADD153</i>	<i>TRAF2</i>	<i>ERN1</i>	<i>EIF2AK3</i>	<i>GADD153</i>	<i>TRAF2</i>
zero	-0.30	0.24	1.88	-0.45	0.17	-0.15	0.76	-0.18
2	1.72	2.29	1.70	-0.19	0.66	0.43	0.76	-0.30
4	1.46	-0.53	-0.20	-0.13	-0.30	0.09	0.26	-0.02
6	1.40	-0.08	0.10	0.35	1.40	0.63	0.75	-0.17

TABELA 8 - Dados brutos da expressão gênica transcricional (qPCR em tempo real) – Valores (log2) do nível de expressão para a linhagem U87MG

U87MG								
tempo pós- tratamento (horas)	H ₂ O ₂				Bleomicina			
	<i>ERN1</i>	<i>EIF2AK3</i>	<i>GADD153</i>	<i>TRAF2</i>	<i>ERN1</i>	<i>EIF2AK3</i>	<i>GADD153</i>	<i>TRAF2</i>
zero	-0.48	-0.69	1.66	-0.35	0.92	1.08	2.58	-0.76
2	0.642	-0.71	2.24	-0.93	1.19	-0.12	1.68	-0.61
4	3.318	2.21	2.16	0.15	1.29	1.28	1.12	0.38
6	1.352	1.87	1.77	-0.61	0.30	0.65	1.12	-0.66